

Cited Reference 2.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平3-500051

⑬ 公表 平成3年(1991)1月10日

⑭ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求	子審査請求 未請求	部門(区分)	3(2)
A 01 N 63/00	A	7057-4H				
63/02	Z	7057-4H				
A 23 C 3/08		8114-4B※				

(全 14 頁)

⑮ 発明の名称 強化広域殺菌剤として使用されるナイシン組成物

⑯ 特 願 平1-507148

⑰ 翻訳文提出日 平1(1989)12月22日

⑱ 出 願 平1(1989)6月16日

⑲ 国際出願 PCT/US89/02625

⑳ 国際公開番号 WO89/12399

㉑ 国際公開日 平1(1989)12月28日

優先権主張 ㉒ 1988年6月22日 ㉓ 米国(US) ㉔ 209,861

㉕ 発 明 者 ブラックバーン ピーター アメリカ合衆国 10036 ニューヨーク州 ニューヨーク ウェスト 44番 ストリート 426

㉖ 出 願 人 バブリック ヘルズ リサーチ アメリカ合衆国 10016 ニューヨーク州 ニューヨーク ファー
インスティテュート オブ スト アヴェニュー 455
ザ シティー オブ ニューヨ
ーク

㉗ 代 理 人 弁理士 三澤 正義

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), MC, NL(広域特許), NO, SE(広域特許), SU

最終頁に続く

請求の範囲

1. ランチオニン含有バクテリオシンとキレート剤から成る組成物。
2. ランチオニン含有バクテリオシンと界面活性剤から成る組成物。
3. ランチオニン含有バクテリオシン、キレート剤及び界面活性剤から成る組成物。
4. 前記ランチオニン含有バクテリオシンがナイシン、サブチリン、エビデルミン、シンナマイシン、ジュラマイシン、アンコベニン及びペプ(Pep) 5から成る群から選択される請求の範囲1、2又は3に記載の組成物。
5. 前記キレート剤がアルキルジアミン四酢酸、Ca EDTA、Na₂ Ca EDTA、EGTA及びクエン酸塩から成る群から選択させる請求の範囲1又は3に記載の組成物。
6. 前記アルキルジアミン四酢酸がEDTAで、前記バクテリオシンがナイシンである請求の範囲5に記載の組成物。
7. 前記界面活性剤がトリトン類(Tritons)、ツウィーン類(Tweens)、グリセリド類、脂肪酸類、乳化剤、四価の化合物類、両性及び陰イオン性界面活性剤から成る群から選択される請求の範囲2又は3に記載の組成物。
8. 食品保存料を同様に含有する請求の範囲1に記載の組成物。

9. 担体、ランチオニン含有バクテリオシン及びキレート剤から成る強化広域殺菌剤。

10. 担体及びランチオニン含有バクテリオシン及び界面活性剤から成る強化広域殺菌剤。

11. 担体、ランチオニン含有バクテリオシン、キレート剤及び界面活性剤から成る強化広域殺菌剤。

12. ナイシン、サブチリン、エビデルミン、シンナマイシン、ジュラマイシン、アンコベニン及びペプ(Pep) 5から成る群から選択されたランチオニン含有バクテリオシン及びアルキルジアミン四酢酸、EGTA及びクエン酸塩から成る群から選択されたキレート剤が、前記殺菌剤が スタフィロコッカス・オーレウス(Staphylococcus aureus)、ストレプトコッカス・ミュータンス(Streptococcus mutans)、リステリア・モノサイトゲネス(Listeria monocytogenes)、ストレプトコッカス・アグラクチアエ(Streptococcus agalactiae)、コリネホルム(Corynebacterium) 属、サルモネラ・チフムリウム(Salmonella typhimurium)、エスシェリシア・コリ(Escherichia Coli)、クレブシエラ・ニューモニア(Klebsiella pneumoniae)、シュードモナス・オールギノサ(Pseudomonas aeruginosa)、バクテリオイデス・ジンギバリス(Bacterioides gingivalis) 及び アクチノバシラス・アクチノマイセテスコミタンス(Actinobacillus actinomycetecountans) から成る群の細菌類の少なくともひとつつに対して増強された有効性を保持する量存在する請求の範囲9、10又は11に記載の強化広域殺菌剤。

13. 前記アルキルジアミン四酢酸がEDTAである請求の範囲12に記載の強化広域殺菌剤。

14. 前記界面活性剤がトリトン類(Triton)、ツウィーン類(Tween)、グリセリド類、脂肪酸、四価の化合物類、乳化剤、両性及び陰イオン性界面活性剤から成る群から選択されかつ前記殺菌剤がグラム陰性菌及びグラム陽性菌から成る群の細菌類の少なくともひとつに対し増強された有効性を保持するに充分な量だけ前記界面活性剤が存在する請求の範囲10又は11に記載の強化広域殺菌剤。

15. ナイシンの濃度が約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と300.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間にあり、キレート剤の濃度が0.1 mMと2.0 mMの間にある請求の範囲12に記載の強化広域殺菌剤。

16. 界面活性剤の濃度が約0.01%と1.0%の間にある請求の範囲14に記載の強化広域殺菌剤。

発明の名称

強化広域殺菌剤として使用される

ナイシン組成物

発明の背景

本願は、1988年6月22日出願の第209,861号の一部継続出願である。ナイシンは、抗菌性を有するポリペプチドで、細菌ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*) の種々の株によって天然に産生される。ナイシンは、ある種のグラム陽性細菌の芽胞成長を阻害する公知の食品保存料である。

時に間違ったり不正確な言い方で抗生物質と言われることもあるが、ナイシンはより正確にはバクテリオシン。すなわち、細菌によって産生されるタンパク質性物質でその原種に近縁の種に対してのみ抗菌活性を有するものとして分類される。ナイシンは、牛乳及びチーズ中に低濃度に見られる天然由来の保存料であり、ヒトに対し全く毒性がなくしかもアレルギー性が皆無であると信じられている。

ナイシンは最近FDAによって、殺菌チーズスプレッド、殺菌プロセスチーズスプレッド及び果物、野菜又は肉入殺菌チーズスプレッド又は同殺菌プロセスチーズスプレッドの直接食品含有物として安全であると認められた。更に、ナイシンはポリペプチドであるので、食品中に残留するナイシン残留物は全て迅速に消化される。

ナイシンの特性についての総説は、ハースト

(Hurst) A による アドバンシス・イン・アプライド・マイクロバイオロジー (Advances in Applied Microbiology) 21:85-123 (1981) に記載されている。この報文は ナイシンについて一般に公知であることを記載している。ナイシンは ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*) によって産生され、アプリン & バレット社 (Apline & Barret Ltd.)、ドアセット (Dorset)、英国から純粋でない西製物ニサプリン™ (Nisaplin™) として商業的に入手可能であり、また、ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*) の培養物から天然のナイシンを単離しこのナイシンを公知の方法で濃縮することによって得ることもできる。別の株の ストレプトコッカス を用いてナイシンを製造する方法もまた報告されている。1987年12月29日発行ゴンザレス (Gonzalez) らによる米国特許第4,716,115号を参照。組換えDNA技術によってナイシンを製造することもまた可能はずである。

ナイシンは、プロセスチーズ、クリーム及び牛乳のような乳製品中の保存料として効果的に用いられてきた。プロセスチーズにおけるナイシンの使用は最近の特許の課題であった。米国特許4,584,199号及び第4,591,972号を参照。あるグラム陽性バクテリアの増殖を阻害するためのナイシンの使用については充分に実証されている。しかしながら、食品保存料としてナイシンが完全に成功し受け入れられるためには、ナイシンがグラム陰性菌及び多くのグラム陽性菌に対し無効であるという考えがこれまでその障害となってきた。

た。グラム陰性菌はほとんど常にグラム陽性菌と共にあり、食品の腐敗及び汚染の主要原因となっている。1986年4月22日発行テイラー (Taylor) の米国特許第5,584,199号及び1986年7月1日発行テイラー (Taylor) の米国特許第4,591,972号、ツァイ (Tsai) 及びサンディーン (Sandine) の コンジュガル・トランスファー・オブ・ナイシン・プラスミド・ジーンズ・フロム・ストレプトコッカス・ラクチス 1962・トウ・ロイコノストック・デキストラニカム 181 (Conjugal Transfer of Nisin Plasmid Genes from *Streptococcus lactis* 1962 to *Leuconostoc Dextranicum* 181), アプライド・エンド・エンバイロメンタル・マイクロバイオロジー (Applied and Environmental Microbiology), 1987年2月, 352頁, "ア・ナチュラル・プリザーバティブ (A Natural Preservative)", フード・エンジニアリング・インターナショナル (Food Engineering Int'l), 1987年5月37-38頁, "フォーカス・オン・ナイシン (Focus on Nisin)", フード・マニュファクチャ (Food Manufacture), 1987年3月, 63頁を参照。

発明の要約

ナイシンから成る組成物が種々の非殺菌性薬剤と併用されると、ナイシン単独に比べてグラム陰性菌に対して強化広域殺菌活性を有しまたより広域のグラム陽性菌に対して強化活性を示すことが先の知見に反して今回見いだされた。グラム陽性菌に対する強化殺菌活性は、先の知見よりも広いpH範囲で発現する。

本発明は、例えば、キレート剤又は界面活性剤のような種々の非殺菌性薬剤と併用するナイシン又は他のランチオン含有バクテリオシン類のバクテリオシン組成物類を提供する。本発明は、更に、強化広域殺菌剤を得るために適切な担体に溶解又は懸濁した本組成物を提供する。

本発明の詳細な説明

例えばEDTAのようなキレート剤約0.1mMから20mMの存在下におけるナイシン約0.1μg/mlから300μg/mlの溶液は、ニシン単独に比べてサルモネラ・チフムリウム (*Salmonella typhimurium*)、エスシェリシア・コリ (*Escherichia coli*)、シュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、バクテリオイデス・ギンギバリス (*Bacterioides gingivalis*)、アクチノバチラス・アクチノマイセテスコミタンス (*Actinobacillus actinomycetescoulans*) 及びクレブシエラ・ニューモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*) のようなグラム陰性菌の増殖を実質的に消失させ、また、スタフィロコッカス・オーレウス (*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、ストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*) 及びコリネホルム (*Corynebacterium*) 菌のようなグラム陽性菌に対しては更に活性であることが特に見いだされた。キレート剤によるナイシン活性の増強は濃度依存性であるが、20mMを超えるEDTA濃度は予想に反しナイシン

の殺菌活性阻害性であった。しかしながら、タンパク質性担体及び血清アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、カゼイン及びケラチンのような多価ポリマー類の存在下においては、20mM以上のEDTA濃度によるナイシンの阻害は有意に低下し、それによってEDTAによるナイシンの強化の有用範囲が拡大された。

約0.1μg/mlから300μg/mlのナイシンと約0.1mMから20mMのキレート剤の溶液が約0.01%から1.0%の界面活性剤の存在下において、グラム陰性菌とグラム陽性菌に対するナイシンの有効性を増強することも同様に見いだされた。更に、界面活性剤の存在下においてナイシンはグラム陽性菌に対する活性を増強することも見いだされた。

本発明の適切なキレート剤としてEDTA、CaEDTA、CaNa₂EDTA及び他のアルキルジアミン四酢酸類、EGTA及びクエン酸塩が挙げられるが、これらに限定されるものではない。キレート剤として有用でEDTAの有無を問わずナイシンと併用する上で適切な界面活性剤として、ツウィーン類 (Tweens)、トリトン類 (Tritons) 及びグリセリドの非イオン性界面活性剤、脂肪酸のようなイオン性界面活性剤、四価の化合物、ドデシル硫酸ナトリウムのような陰イオン性界面活性剤、及びココミドプロピルベタイン及び乳化剤のような両性界面活性剤が挙げられる。

グラム陽性菌及びグラム陰性菌はほとんど常に共存して食品中に見られるので、サルモネラ・チフムリウム (*Salmonella typhimurium*)、エスシェリシア・コ

リ (*Escherichia Coli*)、クレブシエラ・ニューモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*)、シュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、バクテリオイデス・ギンギバリス (*Bacterioides gingivalis*)、アクチノバチラス・アクチノマイセテスコミタンス (*Actinobacillus actinomycetescoulans*) のようなグラム陰性菌及び他のグラム陰性病原菌、及びグラム陽性菌に対してナイシン組成物が有効であることは、極めて有用であろう。この殺菌剤は、生の原料、プロセス食品及び飲料の細菌性病原体及び他の腐敗性微生物菌体による汚染の管理及び防止に特に適している。食品関連用途として、特に家きんの肉、卵、チーズ及び魚肉の処理及び食品包装と処理機器の処理が挙げられる。更に、プロセスチーズ、クリーム、牛乳、乳製品などにおける食品保存料としての用途、及び家きん肉、魚肉、獣肉、野菜及び乳製品及び食品のプロセス装置の洗浄における用途が挙げられる。ナイシン組成物の用途を食品関連用途だけに限定すべきではなく、このナイシン組成物はグラム陰性及びグラム陽性菌を除去する必要性又は要望があるあらゆる状況において有用であるはずである。

本組成物は例えば水溶性溶液又は懸濁液に溶解することができ、又はいずれの適当な液体、コロイド性又はポリマー性基質中にも懸濁することができ、殺菌剤を生成する。本組成物すなわち殺菌剤は、感染治療、包帯又は外科手術用インプラント (埋入物) などの医療用途中軟膏又はコーティング剤に混合することがで

き、また、皮膚又は口腔うがい用広域消毒剤・消毒用ブラシ、清拭剤又はローション剤として取り入れることができる。本殺菌剤は、医療器具の洗浄用、手術用術前ブラシその他において用いることができる。本殺菌剤は、周辺環境の消毒を望んでいるが腐蝕性又は他の毒性残留物の危険があるために化学殺菌剤が除外されているような状況において特に有用である。

複雑な有機物の存在によってその活性が低下するほとんどの広域殺菌剤と異なり、本発明の組成物は牛乳又は血清のような有機物の存在下においても殺菌剤として有効である。

ナイシンは数種の近縁グラム陽性菌の増殖を最も良く阻害し、特にpH5.0においてあるグラム陽性芽胞形成性桿菌を阻害することが公知であった。キレート剤含有ナイシン溶液の殺菌活性は極めて迅速であり、pH5.0を超えるpH値で広域グラム陽性菌に対して本活性は増強されていた。更に、酸性及び塩基性の両pHにおいて、好適にはpH5.0から8.0の範囲において、グラム陰性菌に対して活性化された。キレート剤により活性化されたナイシンの殺菌活性がこのように予想外にも迅速かつ広域であることによって、特に消毒剤としての用途に本ナイシンが適当とされている。

ナイシンは、ランチオン含有ペプチドバクテリオシンの綱に属する。この綱に属するものとしてまた、サブチリン、エビデルミン、シンナマイシン、ジュラマイシン、アンコベニン及び(pep) ペプ5が挙げられ

る。これらのバクテリオシンペプチドはそれぞれ異なる微生物によって産生される。しかしながら、バシラス・サブチラス (*Bacillus subtilis*) の培養物から得たサブチリン及びスタフィロコッカス・エピデルミジス (*Staphylococcus epidermidis*) の培養物から得たエピデルミンは、ナイシンの分子構造に極めて類似の分子構造を有していることが見出された【ハースト (Hurst), 85-86頁, 及びシュネル (Schneil) ら, ネーチャ (Natura), 333:276-278を参照]。したがって、この分子類似性のために、他のランチオン含有ペプチドバクテリオシン類は、グラム陰性及びグラム陽性菌汚染の除去においてキレート剤及び非イオン性界面活性剤と併用しナイシンと同等に有効である。

ナイシン及び拡大して他のランチオン含有ペプチドバクテリオシン組成物のグラム陰性菌に対する殺菌剤としての有効性は驚異的であり、その理由として、先行技術が一般にこのナイシン活性について触れていないことが挙げられる。5.0を超えるpHにおいてEDTA存在下におけるグラム陰性菌に対するナイシンの増強活性は、これまでナイシン活性はpH5.0で至適であると確信されてきたので、予想外である。更に、ナイシン及びランチオン含有ペプチドバクテリオシン組成物の殺菌剤としての有効性が発見されたことによって、広域細菌に対し有効な許容可能でかつ天然由来の無毒の物質がないことに苦慮していた食料保存科学における長期にわたる必要性が満たされる。

ナイシン、EDTA及び/又は種々の界面活性剤含有組成物のグラム陰性及びグラム陽性の両菌に対する活性が優れておりしかも予測し得なかった程迅速であることを示すために、本殺菌剤を用いていくつか試験を行った。これらの試験は例示のためのみに記載されているのであり、本発明を限定するものではない。他のランタニン含有ペプチドバクテリオシン類はナイシンの代替物として有効であること、及びEDTA以外のキレート剤はEDTAの有効代替物であることが予測できる。

下記の実施例の試験は全て37℃で実施した。

強化広域殺菌剤の有効性は、殺菌剤処理後の細菌生存率パーセントで殺菌剤活性を決定し求めた。一般に、標的種の懸濁液1ml当たり 10^7 個の細胞をこの新規殺菌剤と一定時間インキュベート後2分間遠心分離し、細菌を集菌する。この細胞ペレットから本文でファージ (phage) バッファと命名した救済 (レスキュー) バッファ (50mM Tris-HCl バッファ pH 7.8, 1mM MgSO₄, 4mM CaCl₂, 0.1M NaCl 及び0.1%ゼラチン) で殺菌剤を洗い取り、再懸濁後ファージバッファ中に倍數希釈し、この懸濁細菌100mlを栄養寒天プレートに塗布した。37℃で24-48時間インキュベーション後、生存細菌をコロニー形成単位 (CFU) で求めた。本発明の有効殺菌剤は、初期生存細菌數の0.1%未満しか生存させないようなものとする。

実施例 1

グラム陰性菌 (*S. テフムリウム* (*typhimurium*)) に対するナイシン及びキレート剤の活性

表1に示したように、20mMトリス (Tris), pH8.0中で37℃で2試験を行いナイシンとキレート剤EDTAのみを含有する殺菌剤の効果を明らかにした。試験#1は対照でEDTAを含まない条件下で実施し、グラム陰性菌 *S. テフムリウム* (*typhimurium*) に対するナイシン単独の効果を示したものである。ナイシンの濃度上昇に伴い活性が一部発現するが、EDTAの非存在下における高濃度の活性は100μg/mlナイシン当たり1.6%生存率であり、食品保存料として全く不適当である。ナイシン及びEDTAから得た殺菌活性のレベルは有意である。

試験#2 (表1) はナイシンと20mMEDTAを用いて実施し、標的グラム陰性菌の除去においてこのナイシン組成物の優れた活性を示している。

試験#2では20mMEDTAとナイシン30μg/mlの濃度で殺菌剤が *S. テフムリウム* (*typhimurium*) に対して著しい殺菌活性を示すこと、一方、100μg/ml以上のナイシン濃度ではナイシン・EDTA殺菌剤が細菌を実質的に消失させる (生存率パーセント 10^{-4} 未満で、これはアッセイ中に全く生存殺菌がないことを示唆する)。したがって、EDTAとナイシンの併用がナイシン単独に比べて千倍を超える相乗活性を示す。

(以下余白)

表1

EDTA (mM)	ナイシン (μg/ml)	初期生存細菌數	試験#
0	0	3.0×10^6	1
10	10	5.1×10^4	1
20	20	5.1×10^4	2
30	30	1.6×10^1	1
40	40	1.6×10^1	1
50	50	1.6×10^1	1
100	100	1.6×10^1	1
200	200	1.6×10^1	1
300	300	1.6×10^1	1

実施例 2

グラム陰性菌 (S. チフイムリウム
(typhimurium)) に対するナisin、
キレート剤及び界面活性剤の活性

4つの試験(表2)はナisin及びEDTAと界面活性剤トリトン(Triton) X-100の双方を含有する殺菌剤の37℃、20mMトリス(Tris)、pH 8.0中におけるS. チフイムリウム(typhimurium)の効果を調べた。対照(試験#1)は、実施例1の対照と同じである(表1)。

試験#2(表2)は、ナisinと1.0%トリトン(Triton) X-100を用いて行ったが、EDTAを用いなかった。この洗浄剤が存在しているだけでグラム陰性菌に対するナisinの活性は阻害されナisinは無効であった。しかし、本発明を説明する試験#3と#4ではトリトン(Triton) X-100と併用して20mM EDTAが存在することが、S. チフイムリウム(typhimurium)に対するナisinの殺菌活性を著しく増強するひとつの殺菌剤となる。実際、トリトン(Triton) X-100とEDTAの併用でナisinを含有しない場合でも有効であった。但し、ナisinの存在下における場合よりもその度合は弱かった。#3と#4の両試験で(表2)ナisin併用剤は極めて有効であったが、1.0%トリトン(Triton) X-100の濃度(試験#4、表2)が最も有効であった。

EDTAと併用して非イオン性界面活性剤トリトン(Triton) X-100が存在することによって、ナisin

ンとEDTAのみを含有する殺菌剤よりもはるかに強くグラム陰性菌に対するナisinの活性が増強される(実施例1)。

(以下余白)

表2

試験 #	初期生存 細菌数	EDTA (mM)	トリトン X-100 (%)	ナisin (μg/ml)	2時間後の生存率 (%)
1	3.0×10^6	0	0	100	100
2	3.0×10^6	0	1.0	31.4	92.0
3	5.7×10^6	20	0.1	0.03	$<10^{-3}$
4	5.7×10^6	20	1.0	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$

実施例 3

グラム陰性菌 (S. チフイムリウム
(typhimurium)) に対するナisin、
キレート剤及び界面活性剤の活性

表3は、37℃の20mMトリス(Tris)、pH 8.0中におけるナisin、キレート剤EDTA 20mMおよび非イオン性界面活性剤ツウィーン(Tween) 20含有殺菌剤のS. チフイムリウム(typhimurium)に対する活性の増強を示したものである。トリトン(Triton) X-100併用の場合と同じく(実施例2)、ナisinとEDTAを(1%)ツウィーン(Tween) 20と併用することは最も有効である。

(以下余白)

表3

試験 #	初期生存 細菌数	EDTA (mM)	トリトン (%)	ナイシン (μg/ml)					30時間後のE. coli生存率(%)
				0	10	30	50	100	
1	3.0×10^6	0	0	100	51.3	-	7.0	1.6	-
2	5.7×10^6	20	0	2.5	-	$<10^{-3}$	-	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
3	4.3×10^6	20	1.0	$<10^{-3}$	-	$<10^{-4}$	-	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$

殺菌剤としてのナイシンとEDTAの併用は、E. コリ (Coli) に対する有効性を千倍も相乗的に高めることが明らかである。試験#3と#4(表4)から、トリトン(Triton) X-100がE. コリ(Coli)に対する有意な殺菌活性を全く有していないことがわかる。実際、トリトン(Triton) X-100は、S. チフムリウム (typhimurium) でみられたと同様に(表2)グラム陰性菌に対するナイシン活性を阻害するようである。しかし、表2と4からわかるように、EDTAによるナイシンの全般的増強はトリトン(Triton X-100)の阻害効果を実質的に打消す。

ナイシン及びEDTAのようなキレート剤1種を含有する殺菌剤は、界面活性剤の存在下においても種々のタイプのグラム陰性菌に対して有効な食品保存料であることが以上よりわかる。

実施例 5

グラム陰性菌 (クレブシエラ・ニューモニアエ (Klebsiella pneumoniae)) に対する

ナイシン及びキレート剤の活性

ナイシン及びEDTAのみを含有する殺菌剤のグラム陰性菌K. ニューモニアエ(pneumoniae)に対する効果が、表5に示したように明らかとなった。

(以下余白)

特表平3-500051(6)

実施例 4

グラム陰性菌 (エスシェリシア・コリ (Escherichia coli)) に対するナイシン、キレート剤及び

界面活性剤の活性

ナイシン及びEDTA含有殺菌剤のグラム陰性菌E. コリ(Coli)に対する殺菌剤の効果を明らかにし、表4に示した。

表4

試 験 #	初期生存 細菌数	EDTA X-100		ナイシン (μg/ml)				24時間におけるE. coliの生存パーセント
		(mM)	(%)	0	30	100	300	
1	1.0×10^7	0	0	100	27	25	8.5	
2	1.0×10^7	20	0	14.5	0.86	0.01	0.001	
3	1.0×10^7	0	1.0	100	-	30	-	
4	1.0×10^7	20	1.0	1.2	0.8	0.05	<10 ⁻⁴	

37℃の20mMトリス(Tris)バッファ溶液、pH 8.0中で初期生存数を 1×10^7 個E. コリ(Coli)細胞/mlとし試験を行った。EDTAを含有した場合と含有しない場合がある。殺菌剤の効果は、2時間後の細菌生存率パーセントの関数として求めた。

試験#1(対照、表4)ではEDTAを含有せず、ナイシンはE. コリ(Coli)の除去に対してほとんど有意味の活性を示さなかった。しかし、20mMEDTAが存在する試験#2(表4)では、殺菌組成物はE. コリ(Coli)菌に対して実質的な活性を示した。ナイシン濃度の上昇に伴い本活性の有効性は増大した。

表5

試 験	初期生存 細菌数	1977					24時間後の生存率
		EDTA	X-100	ナイシン (μg/ml)			
		(mM)	(%)	0	30	100	
1	10 ⁷	0	0	100	-	50	30
2	10 ⁷	20	0	22	0.5	1.1	0.005

EDTA使用試験を1回、非使用試験を1回、2回の試験を37℃の20mMトリス(Tris)バッファ、pH 8.0中で初期生存K. ニューモニアエ(pneumoniae)細胞数を 10^7 個/mlとし行った。本効果を2時間後の細胞生存率%の関数として測定した。

EDTA非使用試験#1(対照、表5)で、ナイシンはK. ニューモニアエ(pneumoniae)に対し意味のある殺菌活性をほとんど示さなかった。しかし、試験#2(表5)においては20mMEDTAが存在し、本殺菌剤はK. ニューモニアエ(pneumoniae)に対し実質的な活性を示した。ナイシン濃度が上昇するに伴い本活性の有効性が高まった。

実施例 6

グラム陰性菌 (サルモネラ・チフムリウム (Salmonella typhimurium)) に対するナイシン
活性はキレート剤濃度に依存性である。

表6のデータは、グラム陰性菌(S. チフムリウム(typhimurium))に対するナイシンの増強活性化は、50mM酢酸ナトリウム、pH 5.0又は20mMトリス(Tris)、pH 8.0中のいずれかにおいて37℃でED

TA濃度に依存性であることを示している。

ナイシンを使用せず100mMまでのEDTA濃度を用いた試験#1と#3(対照、表6)では、pH5.0(#1)又はpH8.0(#3)のいずれかにおいてS.チフムリウム(*typhimurium*)に対し有意味の活性をほとんど示さなかった。しかし試験#2及び#4(表6)では、ナイシン100μg/mlがEDTAと共存しており、本殺菌剤はS.チフムリウム(*typhimurium*)に対し実質的な活性を発現した。この殺菌剤の活性は酸性pH(5.0)でも塩基性pH(8.0)でも双方において同様であったが、このことは、ナイシン単独のグラム陰性菌に対する活性がpH5.0で至適であるという事実と反していた。

EDTAによるナイシンの増強は、濃度依存性であり、pH値5.0及び8.0において0.2mMから10mMの範囲で至適となる。10mM EDTAを超える濃度においてEDTAによるナイシンの増強が低下するのは驚くべきことである。活性化の低下は、pH5.0よりもpH8.0で有意に著明である。

(以下余白)

表6

試験 #	pH	初期生存 菌数	ナイシン μg/ml	EDTA(mM)					殺菌率 %	対照
				0	0.2	1.0	10	100		
1	5.0	3×10 ⁶	0	100	100	38.7	15.2	2.5	-	100
2	5.0	3×10 ⁶	100	100	0.5	10 ⁻⁴	0.001	0.001	100	100
3	8.0	5×10 ⁶	0	100	-	1.7	11.4	11.4	45	100
4	8.0	5×10 ⁶	100	100	-	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	100	100

実施例 7

グラム陰性菌(S.チフムリウム(*typhimurium*)) に対するナイシン及びキレート剤

EDTAによる生体組織存在下グラム陰性菌に対するナイシン活性の増強が、ニワトリの筋肉上のS.チフムリウム(*typhimurium*)で明らかとなり、表7に示した。

インキュベーションは、pH5.0の50mM酢酸ナトリウム又はpH8.0の20mMトリス(Tris)中のいずれか中で37℃で行った。

さいの目にしたニワトリ筋肉を使用に先立ち次亜塩素酸ナトリウム及びポピドンヨウ素で洗浄した。本組織に接種するために、さいの目にしたニワトリ筋肉をpH8.0の20mMトリス塩酸中S.チフムリウム(*typhimurium*)懸濁液10⁸個細胞/ml中に浸漬した。過剰の水分は、浸漬立方体から取り落として除去した。ニワトリ試料は、本組織を覆うために充分な量のナイシン組成物含有バッファ中に入れ37℃で2時間インキュベートした後、本組織を覆うために充分な量のファージ(phage)バッファに本組織を移した。試験溶液中に残留する細菌を遠心分離によって集菌後ファージ(phage)バッファで洗浄し、ファージバッファによって組織から洗い出された細菌と合わせた。合わせた試料(“非菌着”細胞と命名)を倍數希釈し、アリコット100μlを生存細菌の測定のために塗布した。

ナイシン非存在下pH5又はpH8のいずれいかに

おける試験#1及び試験#3(表7)において、EDTA単独ではS.チフムリウム(*typhimurium*)の生存に有意の効果を全く示さない。しかし、ナイシン300μg/mlが存在する試験#2と#4(表7)では、ニワトリ筋肉上のS.チフムリウム(*typhimurium*)に対しpH5.0及びpH8.0の両pHで本殺菌剤は実質的な活性を示した。

EDTAによるナイシンの増強は濃度依存性であり、pH値5.0及び8.0の両値で0.3mMから10mM EDTAの範囲に至適濃度があった。pH8.0において10mM EDTAを超える濃度では、EDTAによるナイシンの活性化が低下する。しかし、試験#5に示したように(表7)、pH8.0において1.0%ウシ血清アルブミンの存在下では、ニワトリ筋肉上のS.チフムリウム(*typhimurium*)に対するナイシンの有効性が100mMまでのEDTA濃度全範囲で示される。

以上の如く、ナイシン及び0.1mMから20mMの範囲のEDTAのような低濃度のキレート剤含有殺菌剤は、グラム陰性菌による食品汚染の除去又は防止に極めて有効であり得る。

(以下余白)

2

試 験 号	pH	4457					DPTA (g/l)				
		μl/ml	0	0.1	0.3	1	3	10	30	100	
2 時間以上おこなふ場合											
1	5.0	0	11.3	-	-	-	6.4	-	-	-	
2	5.0	300	6.1	0.3	0.03	0.01	0.003	6.016	0.03	0.02 0.07	
3	5.0	0	100	-	-	-	5.2	-	-	-	
4	5.0	300	7.5	0.1	0.02	0.02	0.03	0.47	0.5	- 2.2	
5	5.0	300 *	0.92	0.09	0.0002	< 10 ⁻⁴	0.0004	0.003	-	0.03 0.03	

1 2 時間 測定
* 100% 減圧下 (155) 測定

8

試驗 #	初期生存細菌數	EDTA 35A (μM)	0	0.1	0.3	1.0	3.0	10	30	100
1	6×10^6	0	0	100	-	-	-	51.3	-	1.6
2	6×10^6	1.0	1.0	63	0.7	0.08	0.01	0.03	0.01	<10 ⁻⁶

实例 8

グラム陰性菌 (S. テフイムリウム (typhimurium))
に対するナイシン活性の測定

キレート剤の至適濃度下におけるトリス (Tris) バッファ中本殺菌剤のグラム陰性菌に対する有効性が実質的であることを明らかとし、表8に示した。

は験 #2 から、1%ウシ血清アルブミン (BSA) 存在下 20 mM トリス (Tris), pH 8.0 中 1.0 mM EDTA を含む 0.3 μ g/ml ほどのわずかな量のナisin が、S. チファムリウム (typhimurium) の生存を有意に低下することがわかる。本殺菌剤は、ナisin 単独がグラム陽性 ストレプトコッカス (Streptococcus) に対し活性であるように、グラム陰性菌に対し活性である。

(以下余白)

实 施 例 9

グラム陰性菌 (S. チフムリウム (typhimurium))
に対するナisin 活性の測定

キレート剤の至適濃度下、生体組織存在下におけるグラム陰性菌に対する殺菌剤の有効性を、ニワトリ筋肉上 *S. ティフィリウム (typhimurium)* で明らかにし、表9に示した。

さいの目にしたニワトリ筋肉を次亜塩酸ナトリウム及びポリビドンヨウ素で使用に先立ち洗浄した。本組織に接種するために、pH 8.0 の 20 mM トリス塩酸中 10^8 個細胞/ml の S. ティファムリウム (typhimurium) 懸濁液に浸漬した。過剰の水分を拭り落して浸漬立方体から除去した。本組織を覆うのに充分量のナイシン組成物含有バッファ中に本組織を入れ、37℃で2時間インキュベート後、本組織を覆うために充分量のファージ (phage) バッファに移した。試験溶液中に残留する細菌を遠心分離によって集菌後ファージ (phage) バッファで洗浄し、ファージバッファによって本組織から洗い出された細菌と合わせた。合わせた試料 (「非固着」細胞と命名) を倍數希釈し、アリコット 100 μ l を生存細菌の測定のために塗布した。

(以下余白)

実施例 10

グラム陰性菌 (S. チフイムリウム (typhimurium))
に対するナイシン EDTA 及び

メチルパラベン活性

ナイシン及び EDTA 含有殺菌剤を公知の食品保存料メチルパラベンと併用すると、グラム陰性菌に対しずばぬけて有効であることが明らかとなり、表 10 に示した。

さいの目にしたニワトリ筋肉を次亜塩素酸ナトリウム及びポビドンヨウ素で使用に先立ち洗浄した。本組織に接種するために、さいの目にしたニワトリの筋肉を pH 5.0 の 50 mM 酢酸ナトリウムバッファ中 10^8 個細胞/ml の S. チフイムリウム (typhimurium) 懸濁液に浸漬した。過剰の水分を振り落して浸漬立方体から除去した。本組織を覆うために十分な量のナイシン組成物含有バッファ中に本組織を入れ、37℃で2時間インキュベート後、本組織を覆うために十分な量のファージ (phage) バッファに移した。試験溶液中に残留する細菌を遠心分離によって集菌後ファージ (phage) バッファで洗浄し、ファージバッファによって本組織から洗い出された細菌と合わせた。合わせた試料 ("非固着" 細胞と命名) を倍數希釈し、アリコット $100 \mu\text{l}$ を生存細胞の測定のために塗布した。

試験 #1 (表 10) では、10 mM EDTA の存在下メチルパラベンは、1.0% の濃度においてのみ S. チフイムリウム (typhimurium) に対し効果的であることが示された。しかし、試験 #2 (表 10) では、

表 9

試験 #	pH	初期生存 細菌数	EDTA 85A (mM)	ナイシン ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
				0	10	100	200	300
1	5.0	1×10^7	0	0	100	-	-	-
2	5.0	1×10^7	1.0	1.0	27	0.35	0.003	0.001

300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ナイシンの存在下におけるメチルパラベンとナイシンの S. チフイムリウム (typhimurium) に対する有効性は実質的に改良された。

ナイシン及び EDTA 含有組成物は、食品保存料メチルパラベンの有用性を有意に向上させた。更に、本殺菌剤は、メチルパラベンのような一般に広く認められてはいるが好適性に劣る食品保存料の (使用の) 集中を実質的に低下させることになるか、又はそれらに対する需要を消失させることになる。

(以下余白)

表 10

試験 #	初期生存 細菌数	ナイシン g/ml	EDTA ^a (mM)	メチルパラベン (%)				
				0	0.1	1.0	10	100
1	1×10^6	0	10	11.8	1.0	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
2	1×10^6	300	10	0.03	<10 ⁻⁵	<10 ⁻⁵	<10 ⁻⁵	<10 ⁻⁵

^a 50 mM 酢酸ナトリウムバッファ pH 5.0

^b 50 mM 酢酸ナトリウムバッファ pH 5.0

起こり、グラム陽性菌に関してはpH 5.0を超える好適なpH範囲のpHに依存性である。
(以下余白)

実施例 1.1

グラム陽性菌 (*Staphylococcus aureus* (スタフィロコッカス・オウレウス)) に対するナイシン及びキレート剤の活性

キレート剤によるナイシンの活性化はpH依存性である。表1.1のデータは、pH 8.0においてよりもpH 5.0においてナイシンがS. オウレウス (*aureus*) に対し幾分殺菌性が強くなることを確認したものである。pH 5.0においてEDTAはS. オウレウス (*aureus*) に対しナイシン活性を増強しないが、1.0 mMを超えるEDTA濃度においてはナイシンの殺菌活性に阻害性となる。しかし、pH 8.0におけるEDTA活性化ナイシンの殺菌活性はナイシン単独又はpH 5.0のEDTAと併用した時よりも有意に高い。

ナイシン単独の殺菌活性は、pH 5.0以下で最大となると報告されており (ハースト (Hurst) 参照)、表1.1に示すデータはこれを裏付けるものである。本知見に基づき、S. オウレウス (*aureus*) に対するEDTAのナイシン活性化はより低いpHで同様に最大になると考えられてきた。しかし、表1.1でわかるようにまた予測に反して (表6参照)、EDTAがpH 5.0においてグラム陽性菌に対するナイシン活性を増強することは観察されなかった。しかし、EDTA高濃度によるナイシン活性の阻害はpH 5.0においてもまだ認められた。従って、キレート剤によるナイシン活性化はある濃度範囲のキレート剤においてのみ

表1.1

スタフィロコッカス・オウレウスに対するナイシン殺菌活性に及ぼすEDTAの効果とpHの影響

ナイシン pH	ml	EDTA mM						24時間後における生存率%
		0	0.1	0.3	1.0	3.0	100	
8.0	0	100	-	100	21	100	100	-
8.0	3.0	1.4	0.03	0.01	0.2	0.4	3	55
5.0	0	100	-	-	-	100	-	-
5.0	3.0	0.6	1.0	1.3	1.4	1.8	-	34

a 菌量: 1.0×10^6 CFU/ml

b 100%増殖: 100%増殖/24時間

200ml/100ml/24時間

実施例 1.2

グラム陽性菌に対するナイシン及びキレート剤活性

ナイシン殺菌活性に及ぼすEDTAのpH 8.0における効果は、重要ヒト病原体の1種であるS. オウレウス (*aureus*) に限定されておらず、歯垢の原因であるストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*) (表1.2 A)、食物運搬病原体の1種リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) (表1.2 B)、及び体臭の寄与因子であるコリネホルム (*Corynebacterium*) 従属細菌類の混合群 (表1.2 C) でも観察されている。

(以下余白)

表12A
ストレプトコッカス・ミュータンスに対する
ナイシンの殺菌活性に及ぼすEDTAの効果

pH	ナイシン μg/ml	EDTA mM					
		0	0.01	0.1	0.3	1.0	3.0
8.0	0	100	-	-	-	-	-
8.0	0.1	4.3	1.8	0.04	0.02	0.05	1
		2時間後の生存率%					
		100	-	-	-	-	-
		25	100	100	100	100	100

a 菌量: 6.0×10^8 cfu/ml
b インキュベーションpH8.0の20mM Tris緩衝液中で行った。

表12C
コリネホルム菌に対するナイシン
殺菌活性に及ぼすEDTAの効果

pH	ナイシン μg/ml	EDTA mM					
		0	0.1	0.3	1.0	3.0	10
8.0	0	100	-	4.6	2.6	8	36
8.0	3	0.22	0.03	0.009	0.1	-	0.16

a 菌量: 1.0×10^8 cfu/ml
インキュベーションpH8.0の20mM Tris緩衝液中37℃で行った。

表12B
リステリア・モノサイトゲネスに対する
殺菌活性に及ぼすEDTAの効果

pH	ナイシン μg/ml	EDTA mM					
		0	0.1	0.3	1.0	3.0	10
8.0	0	100	-	-	-	-	-
8.0	2.0	0.71	0.04	0.04	0.02	0.1	0.64
		2時間後の生存率%					
		100	-	-	-	-	-
		14	100	100	100	100	100

a 菌量: 6.0×10^8 cfu/ml
b インキュベーションpH8.0の20mM Tris緩衝液中で行った。

実施例 13

キレート剤活性化ナイシンの迅速殺菌活性

EDTA含有ナイシンから成る殺菌剤は、表13Aに示したデータによって例示されるように殺菌性が迅速である。10⁷ 個細胞/mlのグラム陰性菌 *S. ミュータンス* (*mutans*) 懸濁液をpH7.3の20mMトリス (Tris) バッファ中である範囲の濃度の1mM EDTA活性化ナイシンと37℃でインキュベートした。この懸濁液は0.5分から60分の範囲の種々の時間にわたり前記殺菌剤とインキュベートした。本殺菌剤の殺菌剤としての有効性を生存細菌のパーセントを求めることによって推定した。EDTAによって増強されたナイシンはこの処方において10 μg/mlの少量で、1分間以内に6対数個だけ細菌数を減少させることができる。

迅速な殺菌活性は、有効消毒のための前提条件である。従って、本組成物は特に本文で明らかとしたように、口腔洗浄剤・うがい薬・歯みがき粉又は歯垢形成 *S. ミュータンス* (*mutans*) に有効な他類似歯科用品 (dentifrice) の成分として有効な殺菌剤であることが予測される。

EDTA増強ナイシンのグラム陰性菌に対する2-3時間後の活性を実施例1-7に示した。EDTA増強ナイシンの迅速殺菌活性は、同様にグラム陰性菌に対しても見られ、このことは表13Bのデータによっても例示される。

(以下余白)

表 13 A
EDTAによる増強ナイシンのストレプトコッカス・
・ミュータンスに対する殺菌活性動態

インキュベーション 時間 (分)	1.0mM EDTAとナイシン 濃度/ml					
	0	1	3	10	30	100
0.5	-	-	-	-	-	<10 ⁻⁴
1	-	-	-	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
3	100	0.5	0.002	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	-
15	-	0.03	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	-	-
30	-	-	<10 ⁻⁴	-	-	-
60	100	0.003	-	-	-	-

a 対菌生存数: 1.0×10^7 cfu/ml
インキュベーションはpH7.3の20mMトリス緩衝液中37℃で行った。

表 13 B
EDTAによる増強ナイシンのエスシェリヒ7
・コリに対する迅速殺菌活性

mM EDTA	ナイシン 濃度/ml					
	0	0.3	1.0	3	10	100
1.0	100	100	56	0.37	0.013	0.015

a 対菌生存数: 1.0×10^7 cfu/ml
インキュベーションはpH7.3の20mMトリス緩衝液中37℃で行った。

実施例 14

ナイシン活性のEDTA増強に及ぼす二価カチオンの効果

二価のカチオンはEDTA及び他のキレート剤に結合し、EDTAによるナイシンの活性化を中和すると予測される。しかし、表14のデータによってわかるように、S. ミュータンス (S. mutans) に対するナイシンの殺菌活性は、1mMのCa²⁺イオンの存在下においてさえも1mM EDTAによって増強される。3mMを超えた場合にのみ、Ca²⁺イオンはEDTA活性化ナイシンに阻害性であった。これは特に、カルシウムイオン濃度が関連する口腔洗浄外用剤において重要である。

(以下余白)

表 14
二価のカチオン存在下における
ストレプトコッカスミュータンスに
対するEDTA活性化ナイシンの迅速殺菌活性

ナイシン	CaCl ₂ mM					
	0	0.1	0.3	1.0	3	10
0	100	1分以内にも死滅する				
3	2.9					
3 ^a	0.0042	0.0042	0.032			18
30 ^a	0.0019		0.0003	0.0004	0.06	6.8
100 ^a	<10 ⁻⁴		<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	0.0001	1.5

1.0mM EDTA

a 対菌生存数: 1.0×10^7 cfu/ml

インキュベーションはpH7.3の20mMトリス緩衝液中37℃で行った。

実施例 15

グラム陽性菌に対するナイシン及び界面活性剤活性

ナイシンの殺菌活性は、界面活性剤1種のみと併用した時も同様に有意に増強される。このことは、表15Aに示したようにある限られたナイシン濃度(0.2 μ g/ml)で最も良く例示される。0.1%までの濃度において食品等級の界面活性剤モノラウリンは、複合媒体牛乳中のストレプトコッカス・アガラクチアエ (*Streptococcus agalactiae*) に対し有意の殺菌活性をほとんど示さなかった。ナイシンは0.2 μ g/mlまでの濃度において同様に牛乳中において有意の殺菌活性を示さなかった。しかし、0.1%モノラウリンと0.2 g/mlのナイシンの2液剤の併用は、*S. アガラクチアエ (agalactiae)* に対し極めて強力である。この殺菌剤は、相加効果で期待されるよりも百倍以上強力であり、上記薬剤のいずれかを単独で用いる時よりも1万倍強力である。従って、ナイシンの適用をその使用可能な活性に限定する時、界面活性剤1種を含有するナイシンから成る殺菌剤はさらに有用であると期待できる。

ナイシンの適用をその有効活性に限定した例を表15Bのデータによって例示した。ナイシン及び特にナイシンとEDTAから成る殺菌剤は、*L. モノサイトゲネス (monocytogenes)* に対して殺菌性であるが、表15Bのデータは、牛乳のような複合媒体においてこの有機物に対する有効なナイシン活性が制約を受け

ることを示している。しかし、グリセリドのモノオレアートとナイシンから成る殺菌剤はこの食物運搬病原体に対して牛乳中においても有効である。但し、モノオレアート自体はこの有機物に対し全く殺菌性を有していない。

(以下余白)

表15A

牛乳中ストレプトコッカスアガラクチアエ
に対する37℃におけるナイシン殺菌活性
(モノラウリンによるナイシンの活性化)

ナイシン (μ g/ml)	モノラウリン		
	0	0.01	0.1
	2時間後の生存率%		
0	100	100	4.5
0.02	100	100	0.2
0.2	2.2	0.05	0.0008

a 初期生菌数 : 6.0×10^7 cfu/ml
インキュベーションは37℃の牛乳中で行った。

表15B

37℃の牛乳中リステリア モノサイトゲネス
に対するナイシンの殺菌活性
(モノオレアートによるナイシンの活性化)

ナイシン (μ g/ml)	モノオレアート		
	0	0.1	1.0
	2時間後の生存率%		
0	100	67	63
100	0.56	10^{-3}	10^{-4}

a 初期生菌数 : 5.0×10^7 cfu/ml
インキュベーションは37℃の牛乳中で行った。

特表平3-500051(14)

国際調査報告

PCT/US 89/02625

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
According to International Patent Classification (IPC) or to a suitably modified Classification and IPC	
IPC: A 23 C 19/11, A 61 K 37/02	
2. FIELD OF INVENTION	
3. PRIOR ART	
Classification System	Classification System
IPC	A 23 C, A 61 K
4. SUMMARY OF THE INVENTION	
5. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS	
6. STATEMENTS OF THE INVENTOR	
Country	Country
X	US, A. 738655 (AWLIN & BARRETT LTD) 19 October 1955, see page 2, line 115 - page 3, line 28
A	Chemical Abstracts, vol. 86, no. 1, 1 January 1977, (Columbus, Ohio, US), A.Y. Podenko et al.: "Effect of the antibiotic nisin on pathogenic staphylococci and streptococci" see page 58, abstract no. 594x & Tr. S'evda Mikrobiol. Ukr. 4th 1975, 221-2
7. CERTIFICATION	
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Issuance of the International Search Report
2nd October 1989	24 OCT 1989
International Searching Authority	Signature of International Searching Authority
EUROPEAN PATENT OFFICE	T.K. WILLIS

国際調査報告

US 8902625
SA 29330

This report contains the patent family members relating to the subject documents filed in the above-named international search report. The members are as contained in the European Patent Office (EPO) file no. 8902625. The European Patent Office is in no way liable for those publications which are merely given for the purpose of information.

Patent document related to search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CS-A- 738655	None		

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号
A 23 C 13/10		8114-4B
19/11		8114-4B
A 23 L 3/3526	5 0 1	6977-4B
C 11 D 3/48		7614-4H
// A 61 K 7/16		7252-4C

優先権主張 ②1989年3月1日③米国(US)④317,626

④発明者 ボラック ジューン

アメリカ合衆国 11201 ニューヨーク州 ブルックリン モンタ
ーギュー ストリート 57

④発明者 ガシツク サラ-アン

アメリカ合衆国 10003 ニューヨーク州 ニューヨーク ファー
スト アヴェニュー 317

④発明者 ルビーノ ステファン デイ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ハリソン ヘンリー アヴェニ
ュー 111